

# 细胞膜微小搏动的超分辨率测定

李晶 黄耀熊\* 赵海燕 屠美 陈文心

(昆明总医院医学工程中心, 昆明 650032; 暨南大学生物医学工程研究所, 广州 510632; 中山大学中山眼科中心, 广州 510080. \*联系人, E-mail: [li\\_jingkm@126.com](mailto:li_jingkm@126.com))

**摘要** 在对超分辨率理论作有关修正改进基础上, 通过扩展傅立叶子运动维度, 增加亮度梯度以及应用极大值自适应加权滤波器等手段, 发展出新的以动态序列图像对细胞膜的微小搏动进行测定的新方法. 较之原有方法, 在超分辨能力, 测量精度方面得到提高. 通过对人体红细胞, 植物黄曲霉细胞的检测分析, 得出了一些新发现.

**关键词** 超分辨率 动态序列图像 细胞膜 微小搏动

细胞作为生命的最小单位, 每时每刻都在进行着新陈代谢、呼吸作用、光合作用、信息传导、物质跨膜运输等生命活动, 生命活动的改变可以通过细胞膜的物理化学特性变化体现出来. 因此, 细胞膜的物理特性与细胞生命活动有高度关联, 对细胞物理特性的测定在细胞结构功能研究中至关重要. 由于光学衍射极限以及检测器灵敏度的限制, 普通方法无法对细胞膜搏动如此微小的运动(约30~100 nm)进行检测. 因此, 一些研究探索用特殊的方法去检测其搏动, 已报道的方法包括<sup>[1-4]</sup>: 建立各种分析检测模型, 利用各种微小探针技术来感应搏动并得到检测数据; 利用准弹性激光技术进行检测, 等等. 这些方法中前者是侵入性的, 对细胞本身有影响, 后者则需要较复杂的技术条件. 并且, 测量结果的稳定度不够理想<sup>[5]</sup>. 文献[6]提出了以细胞序列图像进行超分辨率分析的方法, 优点是所需技术条件较为简单, 并且对细胞的检测是非侵入无损测量. 但在所建立的测量方法上有很多不足: ( ) 其测定是以细胞边缘光晕的强度变化为依据, 即设定一强度阈值, 然后跟踪该强度阈值的位置变化. 但该方法没有考虑强度阈值与周边本底强度间的差别梯度的影响, 难以反映所获图像信噪比不同对测定的影响, 故其理论上存在缺陷, 应对其进行修正, 把梯度因素包括进去; ( ) 对细胞的运动估计维数较低, 仅考虑了细胞的平移而没有考虑在其他方向的运动, 使所做的傅立叶分解的误差增大, 应增加分运动维数使分运动更加接近细胞总体运动; ( ) 在其测量分析过程中没有应用合适的抗嘈杂干扰的滤波器. 为此, 本研究拟通过修正超分辨率理论模型公式、补充充分运动维度、在测定分析中加入合适的抗嘈杂干扰滤波器, 引进亮度梯

度来确定所跟踪细胞边缘等方法, 自主提出有关算法对细胞膜的微小搏动进行超分辨率分析, 检测细胞膜微小搏动. 为细胞膜力学特性的研究提供有力手段. 与此同时, 还对人体红细胞, 植物黄曲霉细胞在外部不同物理化学条件下的力学特性变化进行了研究, 得出了一系列重要结果.

## 1 理论与方法

( ) 理论依据. 分辨率之所以能超越经典极限, 它依据两条基本的数学原理:

定理 1: 一个空间有界函数的二维傅立叶变换是频域的解析函数;

定理 2: 频域上的一个任意的解析函数, 若在此平面上的一个任意小的(但有限)的区域内, 精确地知道这个函数的值, 那么整个函数可通过解析延拓(唯一地)求出.

实际的图像应具备非负性和有界性. 这里  $X$  表示物体的大小或范围. 可以用以下形式进行表示:

$$F(x) = f(x) \text{rect}(x/X). \quad (1)$$

这里,  $\text{rect}(x/X)$  为矩形函数,  $f(x)$  的傅里叶谱可分成两部分:  $F_a(u)$  是截止频率以内部分,  $F_b(u)$  是截止频率以外部分. 对(1)式取傅里叶变换有:

$$F(u) = [F_a(u) + F_b(u)] \times \text{sinc}(Xu). \quad (2)$$

从(2)式可以看到, 由于  $\text{sinc}$  函数(称为取样函数, 其

定义为:  $\text{sinc}(x) = \begin{cases} 1, & (x=0); \\ \frac{\sin x}{x}, & (x \neq 0). \end{cases}$  是无限的, 则截止

频率以外的信息通过卷积迭加到了截止频率以内的频率成分中. 换句话说, 对于有界受限物体, 截止频率以内的频率成分中包含了物体的所有信息, 包括低频和低频信息.

在物体成像中,分辨率决定了两个目标能够分开的最小限度. 对于一个目标,当它的粒径小于光波波长时,在一定的显微镜孔径下,它就接近波长的一个小点在暗背景下显示,呈Gaussian分布. 而小于光波波长的目标的准确位置是可以由这个Gaussian分布的图像点精确估计出来的. 同样,对于细胞而言,其膜的搏动尺度小于光波波长,在光镜下无法直接可见,但是细胞周围的衍射光晕(halo)携带了细胞膜边缘精确位置的信息,通过对光晕噪声信号的检测分析,可以得出细胞膜边缘的准确位置,从而测定出细胞膜的微小搏动. 对于红细胞,测量细胞边缘位置的分辨率并不依赖于光学显微镜的分辨率,而是由噪声决定. 本研究所用的CCD(IMAC-CCD30)的像素尺度为 7.5  $\mu\text{m}$ , 实验中每个显示单位为 1/20 个像素. 对于 10 bit 宽动态 CCD 的最大量子误差为 0.035. 依据 COG(center of gravity)算法<sup>[2]</sup>获得整体横向误差为:

$$\sigma_{Pos}^{(tot)} = \frac{\sigma_{Pos}}{\sqrt{N}}. \quad (3)$$

在(3)式中,  $\sigma_{Pos}$  为每个位置的空间估计误差;  $N$  为所分析图像的数量; 对于本实验有:  $\sigma_{Pos} = \frac{7.5}{\sqrt{3000}} \times 0.035 = 0.0047 \mu\text{m}$ , 因此本方法的测量精度约为 5 nm.

超分辨率复原能力是指当噪声存在时,能被复原和重建的超分辨率信息的数量. Sementilli 等人<sup>[8]</sup>对此进行了分析,提出了以下超分辨率复原能力的估算表达式:

$$f_e = \frac{3}{4\pi X} \left[ \text{sinc}^{-1} C_1 - \text{sinc}^{-1} \left( \frac{C_1 T}{\sigma_n} \right) \right]. \quad (4)$$

这里  $f_e$  表示截止频率以外能够复原的频率范围;  $T$  是复原分量的允许误差;  $C_1$  是常数,  $\sigma_n$  是噪声标准差; 从(4)式可以看到,超分辨率复原能力  $f_e$  的大小主要取决于噪声的标准差  $\sigma_n$  和物体的实际大小  $X$ .

为了体现出图像强度阈值与周边本底强度间差别梯度的影响,对上述公式(4)作出必要修正. 引入信噪比( $N$ )、信号梯度( $D_s$ )和噪声梯度( $D_n$ ). 显然  $\sigma_n = k(D_s - D_n)$  或者  $\sigma_n = k_1 D_n (N - 1)$ , 这里  $k, k_1$  为比例系数. 将它代入(4)式有:

$$f_e = \frac{3}{4\pi X} \left( \text{sinc}^{-1} C_1 - \text{sinc}^{-1} \left( k_3 \frac{C_1 T}{D_n (N - 1)} \right) \right) \quad (k_3 \text{ 为比例系数}). \quad (5)$$

由(5)式可知信号梯度越大噪声对复原能力的影响越小,复原能力亦越强. 同时,由(5)式知信噪比越

大复原能力越强. 此式更加明确地反映出图像复原与噪声和信号的直接关系.

( ) 动态序列图像的超分辨率复原. 设  $f(x, y)$  表示原物,  $k$  表示一系列相互平移像的总数,则平移像可用下式表示:

$$f_r(x, y) = f(x + \Delta x_r, y + \Delta y_r), \quad r = 1, 2, \dots, k. \quad (6)$$

如果对上述函数进行抽样,所得的抽样函数为:

$$y_r(m, n) = f(mT_x + \Delta x_r, nT_y + \Delta y_r), \quad m = 1, 2, \dots, M - 1; n = 1, 2, \dots, N - 1 \quad (7)$$

$T_x$  和  $T_y$  分别为  $x$  和  $y$  方向的抽样间隔. 对(6)式取傅立叶变换,则有:

$$Y_K(k, l) = \alpha \sum_{p=-\infty}^{\infty} \sum_{q=-\infty}^{\infty} F_r \left( \frac{k}{MT_x} + pf_{sx} \frac{l}{NT_y} + qf_{sy} \right). \quad \text{其中,} \\ f_{sx} = \frac{1}{T_x}, f_{sy} = \frac{1}{T_y}, \alpha = \frac{1}{T_x T_y}. \quad (8)$$

该方程把  $f_r$  的连续傅立叶变换  $F_r$  和  $f_r$  的离散傅立叶变换  $Y_K(k, l)$  联系在一起. 又:

$$F_r(u, v) = e^{i2\pi(\nabla x_r u + \nabla y_r v)} F(u, v). \quad (9)$$

这里  $u$  和  $v$  分别表示  $x, y$  方向上的空间频率. 最后可得如下关系:

$$Y = \phi F. \quad (10)$$

式中  $Y$  表示  $Y_K(k, l)$ ;  $F$  表示  $F(u, v)$ ;  $\phi$  表示运动估计. 因此通过确定  $k$  幅图像的离散傅立叶变换  $Y_K(k, l)$  和运动估计  $\phi$ , 从(10)式就可解得  $F$ , 然后利用傅立叶逆变换求得  $f(x, y)$ .

( ) 算法的改进. 依据超分辨率理论,采用动态序列图像分析技术,着重解决的主要问题在于:在运动估计算法中,运用区域匹配的方法,使运动像素的确定考虑了局部区域的像素运动的整体效应,具有局部统计意义,这样使像素运动的估计更加精确可靠. 在运动分解模型中,不但考虑了细胞的平动特性,而且考虑到细胞本身的转动,故在模型中加入了切向运动项,增加了分运动的维度,使模型更加接近细胞运动实体,即图 1 中所示出的  $m = 3, m = 4$  项. 在边缘估计方面,在算法中引进亮度梯度对细胞进行跟踪. 见图 2 所示, A 点噪声梯度  $D$  取最大值,由本文所修正的(5)式知道,较之已有的域值法<sup>[6]</sup>,对噪声的敏感降低,有利于超分辨能力的提高,从而提高测量的分辨能力. 在滤波上构造了滤波器—极大值自适应加权平均滤波(maximum adaptive weighted averaging filter, MAWA),使之既可以有效地滤波,又可以保持高亮度点的亮度不退化. MAWA 滤波器是

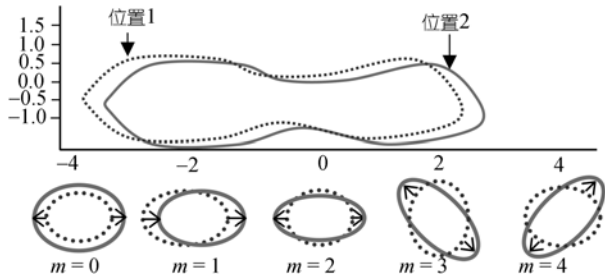


图1 运动分解图示

上面部分为红细胞由位置1运动到位置2的情况。下面部分为运动的5种分解形式，共计有8个不同的运动方向

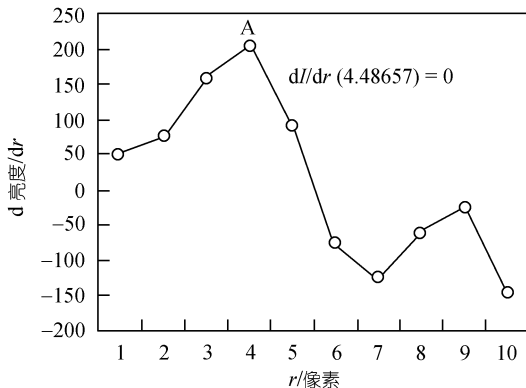


图2 由梯度决定测量所追踪的细胞边缘光晕点A

建立在观察噪声是加性的、与信号无关的零均值的高斯噪声模型基础上的。高斯噪声用其RMS值(标准差)来表征。此滤波器的使用主要目的在于减小噪声的标准差 $\sigma_n$ ，同样由(5)式可知超分辨复原能力得到增强。

## 2 实验与结果

图3所示为实验所用图像分析系统的结构和图像获取原理图。所用的显微镜为TE300(Nikon, Japan)，倒置显微镜，其卤钨稳流光源(100 W)光束通过孔径大小可调的光阑后，经透镜聚焦后照射到样品上。其对应像直径在1~200  $\mu\text{m}$  范围可调。激发光源(汞灯)，可调光阑及可移动模块则用于荧光的激发及荧光图像的摄录和分析。CCD摄像头(IMAC-CCD30, 768  $\times$  572, Altlussheim, Germany)用于摄取显微镜所成显微图像。再用图像捕捉卡(MATROX-METEORII PCI, San Diego, CA, USA)和计算机实现图像的显示、存储、处理和分析。

以红细胞实验为例，以30帧/s的速度获取的红细胞Flicker亮晕(halo)图像。连续记录100 s。通过上述超分辨复原方法处理。求出在halo边缘的8个方向梯度最大值，对动态连续拍摄的3000张图像进行

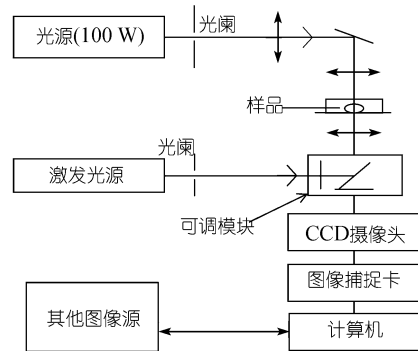


图3 细胞膜微小抖动测量装置图

自动分析。软件分析图例见图4。分析程序自动求出上下两个垂直方向、左右两个水平方向以及45°和135°两个方向共计8个方向的位置波动值。获得8  $\times$  3000个值后，求出其方差 $\delta n$  ( $n = 0, 1, 2, 3$ )，由(11)式，估计出红细胞膜微小抖动的方差 $\delta n_m$ ：

$$\delta n_m = \frac{1}{8} \sum_{n=0}^8 \delta n(n) e^{i2\pi nm/4} \quad (11)$$

继而由如下(12)，(13)和(14)式，可以得到细胞膜的力学特性参量<sup>[9]</sup>：

$$K_C = \frac{R^2 K_B T}{\delta n_m^2} \quad (12)$$

$$\mu = \frac{\varepsilon K_C}{R^2} \quad (13)$$

$$\varepsilon = \frac{\delta n_{m=1}^2}{\delta n_{m=2}^2} \quad (14)$$

式(11)中 $n$ 为分运动的数量， $m$ 为傅立叶分解维。式(12)为弯曲模量 $K_C$ 的计算公式， $R$ 为细胞的半径， $K_B$ 为玻尔兹曼常数， $T$ 为绝对温度。式(13)为剪切模量 $\mu$ 的计算公式，其中 $\varepsilon$ 由式(14)给出。图5为依据本方法所得到的红细胞在不同温度下的弹性膜量、剪切膜量结果。

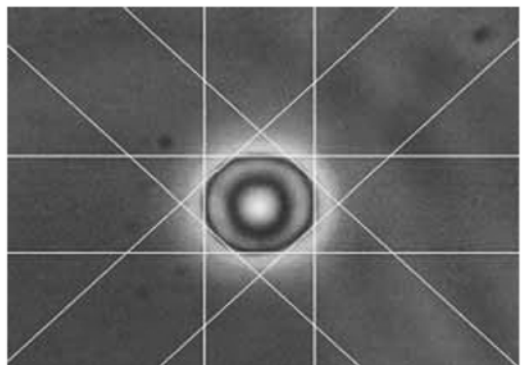


图4 对红细胞 flicker 光晕相差图像的分析界面(1000  $\times$ )

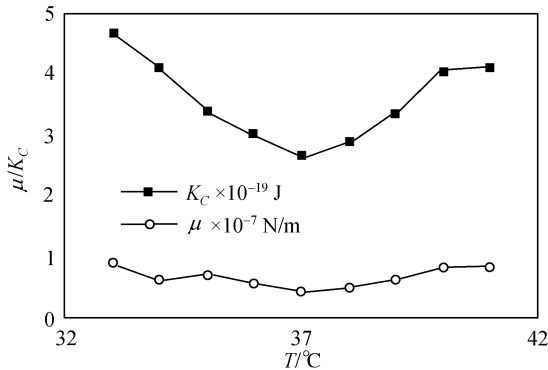


图 5 红细胞在不同温度下的弹性模量、剪切模量的测量结果

### 3 讨论

采用视频序列图像或同一物体的多幅图像进行超分辨率图像复原分析, 如果图像之间存在着相互运动(如平移和旋转), 则这些序列图像含有类似但不完全相同的信息. 本方法就是利用这些不同但相互补充的信息以及物体的先验信息, 从一系列低分辨率的图像恢复出高分辨率的单幅图像. 该思想与单纯用单幅图像超分辨率复原法相比, 其优点是除了利用物体的先验信息和单幅图像的信息之外, 还充分利用了不同图像之间的补充信息, 因此其超分辨率复原能力高. 本文讨论了通过系列图像进行超分辨率复原的理论方法, 发展出可对细胞膜的微小搏动进行超分辨率估计的技术, 并自主开发出相关应用软件, 可精确地检测出细胞膜的运动位移, 精度可达到纳米量级. 在此基础上, 根据有关理论模型, 得到了细胞膜的有关力学特性参数, 由图 5 可见在 37 时, 反映红细胞膜变形特性的弯曲模量  $K_C = 2.75 \times 10^{-19} \text{ J}$  以及反映黏附能力的剪切模量为  $\mu = 0.489 \times 10^{-7} \text{ N/m}$ . 红细胞膜的弯曲模量在 37 时为最小, 说明在 37 时红细胞的变形能力最强, 有利于红细胞与外界的物质交换. 应用此方法对红细胞在不同外部条件(温度、氧分压、渗透压)下的力学参量进行动态监测以及红细胞膜在不同 pH 下的自主变化情况<sup>[10]</sup>. 这与我们先前以激光散射法测定的结果相一致<sup>[9]</sup>. 应用此技术进行了柠檬醛对黄曲霉质膜物理损伤机制研究, 从机理上解释了柠檬醛对黄曲霉质膜的损伤<sup>[11]</sup>.

相对与其他方法而言, 本方法是在无扰、实时、在位的情况下实施测量, 故对细胞的测定较为方便, 准确, 尤其是可反映细胞在外部其他理化

学条件改变的情况下实时在位的情况. 本方法的特点在于, 利用序列和多幅图像发展了新的运动模型, 新模型考虑了细胞膜运动的切向分量, 扩大了分运动维度, 使模型更加接近于真实运动情况; 应用极大值自适应加权平均滤波对成像模型的噪声进行滤除; 对理论公式进行适当修正, 考虑了噪声梯度对提高图像复原能力的影响, 实验中跟踪了光晕的梯度最大值, 使噪声梯度达到最大. 通过这些改进使本方法的测量精度和可靠性均有提高.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30227001, 60377043)、中国博士后基金(批准号: 2004035183)以及广东省科技重点攻关项目基金资助项目.

### 参 考 文 献

- 1 Cheng Z. Kinetics and mechanics of cell adhesion. *J Biomechan*, 2000, 33: 23~33[DOI]
- 2 Flieger R, Grebe R. Cell-elasticity: A new method to measure erythrocyte membrane elasticity. *Biorheology*, 1997, 3(34): 223~234[DOI]
- 3 Ulfendahl M, Khanna S M, Flock A. The vibration pattern of the hearing organ in the waltzing guinea-pig measured using laser heterodyne interferometry. *Neuroscience*, 1996, 1(72): 199~212 [DOI]
- 4 Morgan J J, Surovtsev I V, Lindahl P A. A framework for whole-cell mathematical modeling. *J Theor Biol*, 2004, 4(231): 581~596 [DOI]
- 5 Gode P, Lindbergh G, Sundholm G. *In-situ* measurements of gas permeability in fuel cell membranes using a cylindrical microelectrode. *J Electroanal Chem*, 2002, 518: 115~122[DOI]
- 6 Strey H, Peterson M, Sackmann E. Measurement of erythrocyte membrane elasticity by flicker eigenmode decomposition. *Biophys J*, 1995, 69: 478~488
- 7 Zalevsky Z, Mendlovic D. *Optical Superresolution*. New York: Springer. Springer Series in Optical Sciences, 2003(91): 218~219
- 8 Sementilli P J, Hunt B R, Nadar M S. Analysis of the limit to superresolution in incoherent imaging. *J Opt Soc Am A*. 1993, 10: 2265~2276
- 9 李晶, 黄耀熊, 籍涛, 等. 基于图象分析技术的红细胞膜力学特性多参数动态测量的研究. *生物物理学报*, 2002, 18(3): 351~354
- 10 姚成灿, 黄耀熊, 李校坤, 等. pH 对红细胞膜力学特性和胞内蛋白结构与功能的影响. *科学通报*, 2003, 48(10): 1050~1053
- 11 罗曼, 将立科, 邹国林. 柠檬醛对黄曲霉质膜物理损伤机制的研究. *武汉大学学报(理学版)*, 2002, 2(48): 217~222

(2004-11-02 收稿, 2005-08-08 接受)